

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 62-194459

(43)Date of publication of application : 26.08.1987

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

G01N 33/531

(21)Application number : 61-036835

(71)Applicant : SANKYO CO LTD

(22)Date of filing : 21.02.1986

(72)Inventor : KATO WATARU

(54) STABILIZER OF IMMOBILIZING REAGENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To stably preserve an immobilizing reagent under a dry condition for a long period of time without losing immunochemical activity, by using a stabilizer consisting of water-soluble amino acid or a salt thereof and one or more ammonium salt.

CONSTITUTION: A stabilizer of an immobilizing reagent consisting of water-soluble amino acid or a salt thereof and one or more ammonium salt is used. As water-soluble amino acid, neutral amino acid, oxyamino acid, sulfur-containing amino acid, acidic amino acid, basic amino acid and amino acid having a heterocyclic ring etc. are designated and, as a salt thereof, an alkali metal salt is designated. As the ammonium salt, an inorganic ammonium salt and an organic ammonium salt are designated.

Further, the above mentioned stabilizer to which bovine serum albumin is added can be used.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-194459

⑤ Int. Cl.

G 01 N 33/543
33/531

識別記号

庁内整理番号

A-7906-2G
B-7906-2G

④ 公開 昭和62年(1987)8月26日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全5頁)

⑥ 発明の名称 固相化試薬の安定化剤

⑦ 特 願 昭61-36835

⑧ 出 願 昭61(1986)2月21日

⑨ 発 明 者 加 藤 亘 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

⑩ 出 願 人 三 共 株 式 会 社 東京都中央区日本橋本町3丁目1番地の6

⑪ 代 理 人 弁理士 檜出 庄治

明 細 書

1. 発明の名称

固相化試薬の安定化剤

2. 特許請求の範囲

1. 水溶性アミノ酸およびその塩並びにアンモニウム塩から選ばれた1種または2種以上からなる固相化試薬の安定化剤。

2. ①牛血清アルブミン並びに②水溶性アミノ酸およびその塩並びにアンモニウム塩から選ばれた1種または2種以上からなる固相化試薬の安定化剤。

3. 発明の詳細な説明

〔発明の目的〕

本発明は固相化試薬を乾燥条件下で長期間、免疫化学的活性を損うことなく安定に保存するための安定化剤に関するものである。

ここに固相化試薬とは免疫化学的測定に用いる抗体を固相担体に物理的または化学的に結合させ不溶化した試薬をいう。近年、ラジオイムノアッセイやエンザイムイムノアッセイが広く

行なわれるようになり、すでに多くの測定試薬が実用に供されている。これらの測定試薬の多くは、抗原・抗体結合物を分離する手段として固相化試薬を用いている。そこでこれらの固相化試薬の免疫活性を乾燥状態で長期間安定に保つ方法がいくつか知られている(例えば英国特許2124231号、西独特許2910707号、日本特開昭58-123459号、メソッド イン エンザイモロジー(Methods in enzymology)73巻、224~245頁、1981年)。しかしイムノアッセイは増々高感度化の方向にあり、それにとともに固相化する抗原や抗体も増々希薄な溶液を用いるようになって来ているので、従来法では満足し得なくなり更に強力な安定化の手法の開発が望まれていた。

本発明者らは乾燥状態で免疫活性低下の少ない固相化試薬を開発すべく種々検討の結果、本発明を完成した。

〔発明の構成〕

本発明は、

1. 水溶性アミノ酸およびその塩並びにアンモニウム塩から選ばれた1種または2種以上からなる固相化試薬の安定化剤、または
 2. ①牛血清アルブミン並びに②水溶性アミノ酸およびその塩並びにアンモニウム塩から選ばれた1種または2種以上からなる固相化試薬の安定化剤、
- に関する。

ここに、水溶性アミノ酸としては例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシンのような中性アミノ酸、セリン、スレオニンのようなオキシアミノ酸、メチオニンのようなイオウを含むアミノ酸、アスパラギン酸、グルタミン酸のような酸性アミノ酸、リジン、アルギニンのような塩基性アミノ酸、プロリン、オキシプロリン、ヒスチジンのような複素環を有するアミノ酸などをあげることができる。

また、これらの水溶性アミノ酸の塩としては例えばナトリウム、カリウムのようなアルカリ金属との塩をあげることができる。

- 3 -

～1%、好ましくは0.1～0.5%である。

本発明による固相化試薬の安定化は前述の安定化剤を含む水溶液に固相化試薬を浸漬し乾燥することによつて得られる。

本発明に係る固相化担体には免疫化学測定法に用いる全ての固相担体を包含するが、好ましくはプラスチック、ガラス、紙などから作られたチューブ、ビーズ、ステイック、マイクロタイタープレート状のものが用いられる。固相担体と抗体の結合は物理的吸着または、化学的吸着のいずれでもよい。

抗体を不溶化した固相化試薬の安定化剤を含む水溶液への浸漬処理時間は30分～50時間であるが、一般に低温程長時間を要する。好適には2℃で24時間或いは室温(15℃)で2時間などである。固相化試薬の浸漬処理後の乾燥は自然乾燥、通気乾燥、真空乾燥、凍結乾燥のいずれの方法でもよい。

〔発明の効果〕

次に本発明について実施例をあげて詳細に説

明する。アンモニウム塩としては例えば、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、モリブデン酸アンモニウムのような無機アンモニウム塩、ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、シュウ酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム、酒石酸アンモニウムのような有機アンモニウム塩をあげることができる。

本発明における固相化試薬の安定化剤は、水溶性アミノ酸およびその塩並びにアンモニウム塩から選ばれた1種でもよいが、これらの2種以上を併用して使用することもできる。

あるいは、上記の安定化剤に牛血清アルブミンを添加して使用することもできる。

本発明においては、牛血清アルブミンを添加した方が安定化剤として好適である。

本発明の安定化剤の使用濃度は特に限定はないが、水溶性アミノ酸およびその塩、アンモニウム塩については0.01～1モル、好ましくは0.02～0.3モルであり、牛血清アルブミンは0.01

- 4 -

明する。

実施例 1

抗ウサギ血清ヤギ抗体溶液をトリス-塩酸緩衝液(pH 7.3)に5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に溶解させた液のうち、0.6 mlをポリスチレンチューブ(10×70 mm)に注入し、冷所で24時間放置し不溶化した。抗体溶液を吸引除去し、表1記載の0.1Mアミノ酸水溶液(pH 7.3)で洗浄後、再び所定の安定化剤溶液である前記アミノ酸水溶液を1.5 ml充填し15℃、2時間放置してコーティングした。安定化剤溶液を吸引除去し、真空乾燥して、抗体不溶化チューブ(乾燥品)を作った。なお、対照品として0.3%牛血清アルブミン(BSA)処理したものを作製した。

室温(30℃)で経時的に抗体活性を測定した。ポリスチレンチューブに不溶化した抗ウサギ血清ヤギ抗体の活性測定は次の様に行つた。即ち、抗体不溶化乾燥チューブにリン酸ナトリウム緩衝液0.3 ml, グルコースオキシダーゼ標識17- α -ヒドロキシprogesteron抗原液0.1

mlおよび抗17- α -ヒドロキシprogesteroneウサギ抗血清(50万倍液)0.1 mlを加えよく混和し、4℃で1夜インキュベートした。反応液を吸引除去したのち、リン酸緩衝液で3回洗浄した。これにグルコース、p-ヒドロキシフェニル酢酸、ワサビペーオキシダーゼを加え37℃で3時間インキュベートした。反応停止液0.1 mlを加えたのちよく混和し蛍光測定(Ex 325 nm, Em 407 nm)した。抗体活性(%)は次式を用いて計算した。

$$\text{抗体活性(\%)} = \frac{\text{検体チューブの蛍光強度}}{\text{コントロールチューブの蛍光強度}} \times 100$$

ここに、コントロールチューブは0.3% BSA溶液で浸漬したままのチューブである。

測定結果を表1に示す。

表 1

抗体不溶化チューブの安定化剤処理		抗体活性(%)			
		経時日数(30℃×週)			
		0	4	8	12
対照	0.3% BSA	96	8	0	—
本発明	1.6% L-ヒスチジン	85	76	70	62
	1.2% L-スレオニン	95	75	69	62
	1.8% L-リジン	100	89	78	69
	1.7% L-アルギニン	95	81	72	65

実施例 2.

実施例1において、所定の安定化剤溶液として「前記アミノ酸水溶液」の代りに「(前記アミノ酸水溶液+0.3% BSA溶液)」を用いて同様に実施した。

対照品の調製および抗体活性の測定は実施例

- 7 -

1と同様に行なつた。

測定結果を表2に示す。

表 2

抗体不溶化チューブの安定化剤処理		抗体活性(%)			
		経時日数(30℃×週)			
		0	4	8	12
対照	0.3% BSA	96	8	0	—
本発明	0.9% L-アラニン+0.3% BSA	102	69	61	58
	1.0% L-セリン + "	101	87	72	63
	1.6% L-ヒスチジン+ "	88	85	87	80
	1.2% L-スレオニン+ "	100	85	81	75
	1.8% L-リジン + "	99	96	100	100
	1.7% L-アルギニン+ "	104	105	103	99

- 8 -

実施例 3.

抗ウサギ血清ヤギ抗体溶液をトリス-塩酸緩衝液(pH 7.3)に5 μ g/mlの濃度に溶解させた液のうち、0.6 mlをポリスチレンチューブ(10×70 mm)に注入し、冷所で24時間放置し不溶化した。抗体溶液を吸引除去し、表3記載の0.1 M アンモニウム塩水溶液(pH 7.3)で洗浄後、再び所定の安定化剤溶液である前記アンモニウム塩水溶液を1.5 ml充填し15℃, 2時間放置してコーティングした。安定化剤溶液を吸引除去し、真空乾燥して、抗体不溶化チューブ(乾燥品)を作つた。

対照品の調製および抗体活性の測定は実施例1と同様に行なつた。

測定結果を表3に示す。

表 3

抗体不溶化チューブの安定化剤処理		抗体活性 (%)			
		経時日数 (30℃×週)			
		0	4	8	12
対照	0.3% BSA	96	8	0	—
本発明	0.5%塩化アンモニウム	90	70	61	48
	1.3%硫酸アンモニウム	92	73	60	51
	1.3%リン酸二アンモニウム	91	76	65	50
	2.3%クエン酸二アンモニウム	86	76	67	58

実施例 4.

実施例 3 において、所定の安定化剤溶液として「前記アンモニウム塩水溶液」の代りに「前記アンモニウム塩水溶液 + 0.3% BSA 溶液」を用いて同様に実施した。

対照品の調製および抗体活性の測定は実施例

-11-

リスチレンチューブ (10×70mm) に注入し、冷所で 24 時間放置し不溶化した。抗体溶液を吸引除去し、トリス緩衝液で洗浄後、表 5 記載の所定の安定化剤溶液を 1.5 ml 充填し 2℃、24 時間放置してコーティングした。安定化剤溶液を吸引除去し、真空乾燥して、抗体不溶化チューブ (乾燥品) を作つた。なお、対照品として 0.3% 牛血清アルブミン (BSA) 処理したものを作製した。

抗体活性の測定は、実施例 1 と同様に行なつた。測定結果を表 5 に示す。

-13-

1 と同様に行なつた。

測定結果を表 4 に示す。

表 4

抗体不溶化チューブの安定化剤処理		抗体活性 (%)			
		経時日数 (30℃×週)			
		0	4	8	12
対照	0.3% BSA 処理	96	8	0	—
本発明	0.5%塩化アンモニウム+0.3% BSA	95	100	89	85
	1.3%硫酸アンモニウム+ #	98	95	92	86
	1.3%リン酸二アンモニウム+ #	95	91	77	77
	2.3%クエン酸二アンモニウム+ #	90	92	92	92

実施例 5.

抗 17 α -ヒドロキシprogesteron ウサギ抗血清をトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.3) に 10 μ g/ml の濃度に溶解させた液のうち、0.6 ml をポ

-12-

表 5

抗体不溶化チューブの安定化剤処理		抗体活性 (%)			
		経時日数 (30℃×週)			
		0	4	8	12
対照	0.3% BSA	95	10	0	—
本発明	0.5%塩化アンモニウム+0.3% BSA	98	94	90	85
	1.3%硫酸アンモニウム+ #	100	97	96	93
	1.8% L-リジン+ #	100	99	99	98
	1.7% L-アルギニン+ #	100	99	99	95

実施例 6.

抗サイロキシシン・ウサギ抗血清をトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.3) に 10 μ g/ml の濃度に溶解させた液のうち、0.6 ml をポリスチレンチューブ (10×70mm) に注入し、冷所で 24 時間放置し不溶化した。抗体溶液を吸引除去し、トリス緩衝液で洗浄後、表 6 記載の所定の安定化剤溶液

-14-

を1.5 ml 充填し2℃、24時間放置してコーティングした。安定化剤溶液を吸引除去し、真空乾燥して、抗体不溶化チューブ（乾燥品）を作った。なお、対照品として0.3%牛血清アルブミン（BSA）処理したものを作製した。

抗体活性の測定はグルコースオキシダーゼ標識17- α -ヒドロキシプロゲステロン抗原液をグルコースオキシダーゼ標識サイロキシン抗原液に変え、実施例1と同様に行なつた。この場合、抗17- α -ヒドロキシプロゲステロン・ウサギ抗血清は不要である。

測定結果を表6に示す。

表 6

抗体不溶化チューブの安定化剤処理		抗体活性(%)			
		経時日数(30℃×週)			
		0	4	8	12
対照	0.3% BSA	98	15	0	—
本発明	0.5%塩化アンモニウム+0.3% BSA	98	95	90	83
	1.3%硫酸アンモニウム+ #	100	97	94	90
	1.8%L-リジン+ #	100	98	96	95
	1.7%L-アルギニン+ #	100	98	95	93

特許出願人 三 共 株 式 会 社
代 理 人 井 堀 士 権 出 庄 治